

Concise Explanation of Japanese Reference

Unexamined Published Japanese Patent Application No. Hei
8-205893

METHOD FOR MEASURING ACTIVITY OF HCV PROTEASE

Provided are a method for measuring HCV protease activity, which method has an advantage in operability and quantification, and a screening method for an HCV protease inhibitor.

Recombinant HCV protease is obtained by expressing the NS3 and NS4 regions of the Hepatitis C virus genome in *E. coli*. The HCV protease thus obtained can be used in the reaction system comprising synthetic peptide substrate, which is provided for measuring the protease activity or for screening for protease inhibitors. For measuring the protease activity, a recombinant HCV protease isolated and purified from *E. coli* is allowed to react with a synthetic peptide substrate labeled with biotin or an antigen or antibody (label A). The labeled peptide cleaved with the protease is further labeled with another antigen (label B), followed by conjugation of an enzyme-labeled antibody to detect the protease activity. For screening for a protease inhibitor, progression of proteolysis is monitored in the reaction system comprising HCV protease and synthetic peptide in the presence or absence of a test compound, followed by comparison of the two resultant protease activity.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-205893

(43) 公開日 平成8年(1996)8月13日

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/37		6807-4B		
C 1 2 N 9/64	Z			
C 1 2 Q 1/02		6807-4B		
1/70		9453-4B		
G 0 1 N 33/573	A			

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願平7-304186

(71) 出願人 000002118

住友金属工業株式会社

(22) 出願日 平成7年(1995)11月22日

大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

(31) 優先権主張番号 特願平6-304877

(72) 発明者 竹下 徳木

大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

(32) 優先日 平6(1994)12月8日

住友金属工業株式会社内

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(72) 発明者 垣内 信子

大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

住友金属工業株式会社内

(72) 発明者 菰田 泰正

大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

住友金属工業株式会社内

(74) 代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外6名)

(54) 【発明の名称】 HCVプロテアーゼ活性測定法

(57) 【要約】

【目的】 操作性および定量性に優れたHCVプロテアーゼ活性の測定法、ならびにHCVプロテアーゼ阻害剤のスクリーニング法を提供する。

【構成】 C型肝炎ウイルス(HCV)前駆体ポリプロテインの非構造タンパク質中のNS3領域およびNS4A領域、ならびに場合によりそれより下流領域をコードする遺伝子を大腸菌で発現させ、単離精製して得られるHCVプロテアーゼと、合成基質ペプチドとを試験管内で反応させることからなる、HCVプロテアーゼ活性の測定法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 C型肝炎ウイルス（HCV）前駆体ポリプロテインの非構造タンパク質中のNS3領域およびNS4A領域、ならびに場合によりそれより下流領域をコードする遺伝子を大腸菌で発現させ、単離精製して得られるHCVプロテアーゼと、合成基質ペプチドとを反応させることからなる、HCVプロテアーゼ活性の測定法。

【請求項2】 HCVプロテアーゼが、NS3領域およびNS4A領域を含む領域をコードする遺伝子を用いて発現させたものである、請求項1記載の測定法。

【請求項3】 HCVプロテアーゼが、NS3領域、NS4A領域およびNS4B領域を含む領域をコードする遺伝子を用いて発現させたものである、請求項1記載の測定法。

【請求項4】 HCVプロテアーゼが、NS3領域、NS4A領域、NS4B領域およびNS5A領域を含む領域をコードする遺伝子を用いて発現させたものである、請求項1記載の測定法。

【請求項5】 HCVプロテアーゼが、NS3領域、NS4A領域、NS4B領域、NS5A領域およびNS5B領域を含む領域をコードする遺伝子を用いて発現させたものである、請求項1記載の測定法。

【請求項6】 合成基質ペプチドがNS3/NS4A、NS4A/NS4B、NS4B/NS5AまたはNS5A/NS5Bの各切断部位近傍のペプチド、あるいはこれらのペプチド中のコンセンサスアミノ酸以外の1または2以上のアミノ酸を置換、欠失または付加したペプチドである、請求項1記載の測定法。

【請求項7】 合成基質ペプチドが10～20アミノ酸である、請求項6記載の測定法。

【請求項8】 合成基質ペプチドがNS5A/NS5B切断部位近傍のペプチドである、請求項6記載の測定法。

【請求項9】 C型肝炎ウイルス（HCV）前駆体ポリプロテインの非構造タンパク質中のNS3領域およびNS4A領域、ならびに場合によりそれより下流領域をコードする遺伝子を大腸菌で発現させ、単離精製して得られるHCVプロテアーゼと、合成基質ペプチドとを反応させる系において、反応系に試験化合物を添加し、該合成基質ペプチドの切断反応の進行を、試験化合物添加のものとは添加しないものとで比較することからなる、HCVプロテアーゼ阻害剤のスクリーニング法。

【請求項10】 以下の工程からなる、請求項1記載のHCVプロテアーゼ活性の測定法：

(1) C型肝炎ウイルス（HCV）前駆体ポリプロテインの非構造タンパク質中のNS3領域およびNS4A領域、ならびに場合によりそれより下流領域をコードする遺伝子を大腸菌で発現させ、単離精製して得られるHCVプロテアーゼと、ビオチンまたは抗原物質または抗体

物質で標識（標識a）した合成基質ペプチドとを反応させる；

(2) 工程(1)の切断産物である標識ペプチドを、さらに抗原物質で標識（標識b）する；

(3) ペプチドに標識した前記抗原物質に、前記抗原に対する酵素標識抗体を結合する；そして

(4) 工程(3)の酵素の活性を測定する、ただし、工程(2)、工程(3)または工程(4)の前に、標識aに対する親和性を利用して標識ペプチドの固定化を行う。

【請求項11】 合成基質ペプチドがシステインを含む場合、抗原物質による標識（標識b）に先立って、システインのチオール基が抗原で標識されないようにチオール基を修飾しておくことを特徴とする請求項10記載の測定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は、抗HCV剤開発に不可欠なアッセイ系に関する。より詳しくは、本発明はHCVプロテアーゼ活性の測定法に関する。

【0002】

【従来の技術】本邦に於ける慢性非A非B型肝炎患者は120万人いると推定されているが、その6割がC型肝炎ウイルス（HCV）に因るものであるとされている。又、慢性C型肝炎は高い確率で肝硬変、肝細胞癌へ移行するとされる。しかも、HCVキャリアーは本邦では人口の1～2%を占め、若年層になるにつれて比率は低下するものの、これらキャリアーは将来肝炎発症のリスクを負っていることになる。したがって、非A非B型肝炎発症時の早い時期にウイルスを排除することが必要である。インターフェロンによる治療は最も一般に行なわれる治療であるが、その治療率は20～40%に過ぎず、また深刻な副作用や高価な経費の問題を有している。そこでより効果的な抗HCV剤の開発が望まれている。

【0003】HCVは1988年に米国Chiron社がウイルスの遺伝子の一部の塩基配列を明かにして以来（(Q.-L. Choo et al., Science, 244, 359, (1989), G. Quo, et al. Science, 244, 362 (1989)）、分子生物学的手法による遺伝子解明がなされた。その結果HCVはフラビウイルス、ベスチウイルスに近似のRNAウイルスであることが明かとなった。これらウイルスは、遺伝子である一本鎖RNAをmRNAとして、宿主細胞中で一続きの長い蛋白が翻訳される。ウイルス蛋白はウイルス粒子を構成する構造蛋白とウイルス生活環のなかで必要な機能を担っている非構造蛋白（NS）とに分けられるが、構造蛋白は宿主のエンドペプチダーゼで切断を受け、非構造蛋白はウイルス遺伝子から翻訳されるプロテアーゼで切断され、機能型の蛋白となる。ウイルス由来プロテアーゼは他のウイルス例えばHIV（ヒト免疫不全ウイルス）等のレトロウイルス、HAV（A

型肝炎ウイルス)等のピコーナウイルスにも存在が確かめられている(H.-G. Krausslich and E. Wimmer, Ann. Rev. Biochem. 57, 701, (1988))。HCV、あるいはフラビウイルスに属する黄熱病ウイルス(T. J. Chambers et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 8898 (1990))では、ウイルスプロテアーゼ阻害によってウイルスの感染性が失われことが明かにされている。HCVに於ては上記のごとく遺伝子解析によってプロテアーゼの存在が予測されていたが、実際にプロテアーゼ活性を確かめたのはウイルス遺伝子DNAの無細胞転写翻訳実験あるいは動物細胞(M. Hijikata et al., J. Virol., 67, 4665 (1993), A. Grakoui et al., J. Virol., 67, 2832 (1993))または人腸菌内での一過性の発現系においてである。

【0004】これに対して、単離精製した酵素を用いてプロテアーゼ活性を測定する酵素反応系は、操作性の良さ、定量性が期待できる。特平表5-507612号には、単離精製した酵素を用いたアッセイの可能性が示唆されているが、内容は予備的であり、新規酵素として必要な要件を満たしていない。即ち、酵素の物質としての特性、アミノ酸配列の特定、酵素の作用としての切断部位の特定、あるいは力価の測定法等も示されていない。

【0005】本発明者らは先の特許出願(特願平5-18854号)において、単離精製したNS3酵素を用いたアッセイの可能性を示すとともに、酵素特性、切断部位を明かにした。ここでNS3酵素とは、HCVの非構造タンパク質領域のNS3領域に存在するプロテアーゼをいう(図1参照)。しかし、NS3のみの発現による酵素は不安定で活性も低く、より安定で切断活性の高い酵素が望まれている。

【0006】一方、酵素の活性に寄与する他の蛋白の可能性として、Failla等は、Hela細胞においてNS3のみではなくNS4Aを発現することがNS3/NS4A、NS4B/5Aの切断には必要であり、又、NS4Aの発現によりNS4A/4B、NS4B/5Aの切断も加速されると報告している(J. Virol., 68, 3753-3760 (1994))。しかしこのような動物細胞発現系では、上記のごとく操作性や定量性の点で各種の問題を有する。即ち、細胞培養系によるプロテアーゼ阻害剤のアッセイは酵素反応系に比べて、操作性の点で以下の欠点をもつ：

1. Failla等の方法によるアッセイを行うには、
 - i) Hela細胞を 4×10^6 cells / plateまで前培養する(1日～7日)
 - ii) Hela細胞にワクシニアウイルスを吸着させる(～2時間)。
 - iii) 発現ベクターのトランスフェクションする(～1時間)
 - iv) 32 S-メチオニンでラベルする(～1時間)
 - v) 3時間後細胞を回収する

vi) 蛋白をイムノプレシピテーションする、ことが必要であり、以上の手順で少なくとも2日を要する。

2. 細胞培養用の培地、血清、使い捨て器具を含めて消耗品に費用がかかる。

3. 無菌操作等の操作が煩雑であり、熟練を要する。

4. 細胞の操作にクリーンベンチ、組換え実験にはそれに適した施設が必要である。

【0007】また、感度、定量性については以下の欠点を有する：

1. 細胞で発現される微量の蛋白の検出をするため、放射性同位体か同等の高い感度を有する検出方法を用いなければならない。

2. 結果が細胞の状態に大きく依存し、アッセイ間で値がばらつく。

3. 酵素反応の量的および時間的コントロールが困難である。即ち酵素および基質の細胞で生合成され、酵素反応が引き続いて起こり、生合成と酵素反応がほぼ平行して起こっているため、酵素及び基質の量、酵素反応の開始の時点を決めにくい。

4. 細胞に含まれる未知の因子の関与を否定するため、数多くのコントロール実験が必要である。

【0008】したがって、より簡単な操作で、定量性に優れたHCVプロテアーゼ活性の測定法が求められている。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】感染性のあるHCVの産生にはウイルス蛋白のプロセッシングが必須であると考えられる。したがって、HCV非構造蛋白のプロセッシングに必須のウイルスプロテアーゼの阻害は、HCV感染を阻止すると考えられ、したがって副作用の少ない有効な抗HCV剤となる可能性を有している。このような阻害剤開発には、効率のよいHCVプロテアーゼ活性の測定法の確立が不可欠である。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、上記従来技術のもつ欠点を克服して効率のよいHCVプロテアーゼ活性測定法を完成させるべく鋭意研究した結果、HCVプロテアーゼとして従来必要十分と考えられていたNS3領域のみでなく、NS3より下流域を同時に大腸菌で発現し、簡便な精製法で単離することにより、安定で切断活性の高い単離酵素を大量に得ることができた。また、HCVプロテアーゼの切断部位近傍の合成ペプチドを基質として用い、上記酵素と組み合わせることにより、操作性および定量性に優れた測定法を完成することに成功した。また、本発明のHCVプロテアーゼ活性の測定法はプロテアーゼ阻害剤のスクリーニングにも有用である。

【0011】すなわち、本発明は、C型肝炎ウイルス(HCV)前駆体ポリプロテインの非構造タンパク質中のNS3領域およびNS4A領域、ならびに場合により

それより下流領域をコードする遺伝子を大腸菌で発現させ、単離精製して得られるHCVプロテアーゼと、合成基質ペプチドとを反応させることからなる、HCVプロテアーゼ活性の測定法を提供する。

【0012】さらに、本発明は、C型肝炎ウイルス(HCV)前駆体ポリプロテインの非構造タンパク質中のNS3領域およびNS4A領域、ならびに場合によりそれより下流領域をコードする遺伝子を大腸菌で発現させ、単離精製して得られるHCVプロテアーゼと、合成基質ペプチドとを反応させる系において、反応系に試験化合物を添加し、該合成基質ペプチドの切断反応の進行を、試験化合物添加のものと添加しないものとで比較することからなる、HCVプロテアーゼ阻害剤のスクリーニング法を提供する。

【0013】本発明の測定法およびスクリーニング法では細胞培養系を使用せず、試験管内で、単離精製したHCVプロテアーゼと合成基質ペプチドを使用する。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明において、発現させるHCVプロテアーゼ領域としてはNS3およびNS4Aを含む領域であれば、いかなる箇所でもよい。したがって、発現させるHCVプロテアーゼ領域としては、

- i) NS3領域およびNS4A領域を含む領域、
- ii) NS3領域、NS4A領域およびNS4B領域を含む領域、
- iii) NS3領域、NS4A領域、NS4B領域およびNS5A領域を含む領域、あるいは
- iv) NS3領域、NS4A領域、NS4B領域、NS5A領域およびNS5B領域を含む領域、

が含まれる。又、HCVにはいくつかのサブタイプが知られているが、いずれのサブタイプのアミノ酸配列を用いてもよい。

【0015】上記のHCV非構造領域遺伝子に相当するcDNA断片の構成および構築は先の特許出願の明細書(特願平5-18854号)、及びJ.Virol., 67, 4665 (1993)、あるいはProc.Natl. Acad.Sci. USA, 90, 10773(1993)に述べる方法によって実施できる。

【0016】HCVプロテアーゼは上記遺伝子を用い、大腸菌、動物細胞、昆虫細胞、ウサギ網状赤血球溶血液などで発現させることができる。

【0017】これらのHCVプロテアーゼを発現させる発現ベクターは、効率よく融合蛋白の発現できるものならばいかなるものでもよい。例えば、pTZ18、pTZ19、pUC18、pUC19、Bluescript KS、SK、pHSG398、pRSET、pGEX-2T、pRIT2Tなどが挙げられる。発現したプロテアーゼの安定性を増し、精製が容易に行えるように、プロテアーゼのアミノ酸末端側にマルトースバインディングプロテイン(MBP)との融合した状態で発現するpMAL-cなどが好ましい。発現に用いる大腸菌株としてはHB101、TB1、JM105などを用いることができるが、組換えプラスミドの変異が起りにくいrecA⁻の菌株JM109が好ましい。

【0018】基質として用いる合成ペプチドは、HCVプロテアーゼの切断部位として特定されているNS3/NS4A、NS4A/NA1B、NS4B/NS5A、NS5A/NS5Bの各切断部位近傍のアミノ酸配列を有しているものであればよく、これらのコンセンサスなアミノ酸以外の1または2以上のアミノ酸を置換、欠失または付加してもよい。コンセンサスなアミノ酸とはNS3/NS4A、NS4A/NA1B、NS4B/NS5A、NS5A/NS5Bの各切断点近傍のアミノ酸配列に保存されたアミノ酸のことである。即ち、以下の表I中の下線で示したアミノ酸のことである。

【0019】

表I

HCVサブタイプ	配列	HCV中の部位
H-FDA	CMSADLEVVT STWVLGGVL	NS3 / NS4A
H-AP	CMSADLEVVT STWVLGGVL	
HCV-1	CMSADLEVVT STWVLGGVL	
HCV-J	CMSADLEVVT STWVLGGVL	
HCV-BK	CMSADLEVVT STWVLGGVL	
HC-J6	CMQADLEVMT STWVLGGVL	
HCV-T	CMSADLEVVT STWVLGGVL	
HC-J8	CMQADLEIMT SSWVLGGVL	
HCV-JT, JT'	CMSADLEVVT STWVLGGVL	
H-FDA	YQEFDEMERC SQHLPYIEQG	NS4A / NS4B
H-AP	YQEFDEMERC SQHLPYIEQG	
HCV-1	YREFDEMERC SQHLPYIEQG	
HCV-J	YQEFDEMERC ASHLPYIEQG	
HCV-BK	YQEFDEMERC ASHLPYIEQG	
HC-J1, J4	YEADEMERC ASRAALIEEG	
HCV-T	YQEFDEMERC ASHLPYIEQG	

7			
HC-J8	YQAFDEMEEC	ASKAALIEEG	
HCV-JT, JT'	YREFDEMEEC	ASHLPYIEQG	
H-FDA	WISSECTTPC	SGSWLRDIWD	NS4B / NS5A
H-AP	WISSECTTPC	SGSWLRDIWD	
HCV-1	WISSECTTPC	SGSWLRDIWD	
HCV-J	WINEDCSTPC	SGSWLKDVWD	
HCV-BK	WINEDCSTPC	SGSWLRDVWD	
HC-J1, J4	WITEDCPIPC	SGSWLRDVWD	
HCV-T	WINEDCSTPC	SGSWLRDVWD	
HC-J8	WITEDCPVPC	SGSWLQDIWD	
HCV-JT	WINEDCSTPC	SGSWLKDVWD	
HCV- JT'	WINEDCSTPC	SGSWLRDVWD	
H-FDA	GADTEDVVCC	SMSYTWGAL	NS5A / NS5B
H-AP	GADTEDVVCC	SMSYSWTGAL	
HCV-1	EANAEDVVCC	SMSYSWTGAL	
HCV-J	GEAGEDVVCC	SMSYTWGAL	
HCV-BK	EEASEDVVCC	SMSYTWGAL	
HC-J6	SEEDSVVCC	SMSYSWTGAL	
HCV-T	EEDGEGVICC	SMSYTWGAL	
HC-J8	SDQEDSVICC	SMSYSWTGAL	
HCV-JT, JT'	GEASDDIVCC	SMSYTWGAL	
コンセンサス	D C S		
	E T A		

(Grakoui, et al., J. Virol., 67, 2832(1993))

【0020】上記コンセンサスなアミノ酸DまたはE、CまたはT、ならびにSまたはAは各位で自由に組み合わせることができる。すなわち、上記のD、C、SやE、T、Aの組み合わせのみでなく、D、T、SやE、C、Sの組み合わせであってもよい。

【0021】合成ペプチドの長さは5～25アミノ酸がよいが、好ましくは、10～20アミノ酸である。例えば、YQAFDEMEEC ASHLPYIEQG、WINEDCSTPC SGSWLKDVWD、GEAGDDIVCC SMSYTWGAL等があげられる。最も好ましいものは、GEAGDDIVPC SMSYTWGAL、GEAGDDIVPC SMSYTW T、DDIVPC SMSYTW T、DDIVPC SMSYTであり、これらは大腸菌内で切断反応が最も速く進行するNS5A / NS5Bの切断点を含むアミノ酸配列をほぼ有している。しかも本来のアミノ酸配列GEAGDDIVCC SMSYTWGALでは、隣り合った2つのシステインが速やかにジスルフィド結合を形成して酵素反応を受けない化合物になる欠点を、P2をプロリンに変換することによって改良したものである。P2位のプロリンは天然型 NS4B / NS5A切断点に存在しており、HCVプロテアーゼの天然型切断点の認識になんら支障を与えるものではないのみならず、ペプチドの溶解性を高める。

【0022】また、これらのペプチドのN末端あるいはC末端を蛍光、発光、発色基、アフィニティーリガンド、抗原などでラベルすることができる。例えば、N末端を蛍光試薬のダンシル基(Dns-)、FITC基でラベルしたものはHPLC検出で感度よく夾雑物の干渉なくペプチドの

シグナルを検出することができる。又、アフィニティーリガンドであるビオチンをN末端あるいはC末端ラベルし、アビジンコートしたマイクロタイタープレートに固定化し、ELISA法で検出が行なえる。または、ABC法で検出することもできる。さらに、抗原であるジゴキシゲニン(Dig)でN末端あるいはC末端をラベルすれば、抗Dig抗体で検出できる。

【0023】酵素反応の条件として、pHは5～10で行なうことができるが、好ましくはpH7～8である。二価のイオンとして、カルシウム、マグネシウム、マンガンを加えることができる。反応温度は0～90℃で行なうことができるが、好ましくは25～60℃である。

【0024】反応の検出はHPLC、TLC、ELISA法を用いることができる。

【0025】反応は経時的に進行し、

- i) NS3領域およびNS4A領域を含む領域、
 - ii) NS3領域、NS4A領域およびNS4B領域を含む領域、
 - iii) NS3領域、NS4A領域、NS4B領域およびNS5A領域を含む領域、および
 - iv) NS3領域、NS4A領域、NS4B領域、NS5A領域およびNS5B領域を含む領域、
- を発現させたHCVプロテアーゼのいずれを用いても2時間後には基質の90%以上が切断された。これに対してNS3領域のみを発現させたHCVプロテアーゼを用いた場合には反応の進行が他のプロテアーゼに比べて著

しく遅かった(図3および表2参照)。

【0026】さらに、このような本発明のHCVプロテアーゼ活性測定法を用いてプロテアーゼ阻害剤をスクリーニングすることができる。上記したHCVプロテアーゼと、合成基質ペプチドとを反応させる系において、反応系に阻害剤の候補となる試験化合物を添加し、該合成基質ペプチドの切断反応の進行を、試験化合物添加のものと添加しないものとで比較することによってスクリーニングを行うことができる。本発明のスクリーニング法においては、実施例4に示すように、酵素反応液に試験化合物を加えて、37℃15分ブレインキュベーションし、次いでN末端を蛍光標識したペプチド基質を添加して37℃で10分反応させる。その後、90℃5分加熱して反応を止め、氷上保存して測定できる。したがって、1時間以内で測定を完了することができ、上記した細胞培養系に比べて極めて短時間で測定を行うことができる。また、無菌操作などの煩雑な操作を伴わず、使用する施設も簡単なものでよい。さらに、細胞を用いないので、細胞培養系に比べて測定間のバラツキがなく、信頼のおける結果が得られる。放射性同位体などの検出方法を用いる必要がない点も本発明の利点である。

【0027】本発明の別の態様では、本発明は、以下の工程からなるHCVプロテアーゼ活性の測定法を提供する：

(1) C型肝炎ウイルス(HCV)前駆体ポリプロテインの非構造タンパク質中のNS3領域およびNS4A領域、ならびに場合によりそれより下流領域をコードする遺伝子を大腸菌で発現させ、単離精製して得られるHCVプロテアーゼと、ビオチンまたは抗原物質または抗体物質で標識(標識a)した合成基質ペプチドとを反応させる；

(2) 工程(1)の切断産物である標識ペプチドを、さらに抗原物質で標識(標識b)する；

(3) ペプチドに標識した前記抗原物質に、前記抗原に対する酵素標識抗体を結合する；そして

(4) 工程(3)の酵素の活性を測定する；ただし、工程(2)、工程(3)または工程(4)の前に、標識aに対する親和性を利用して標識ペプチドの固定化を行う。

【0028】この方法は、HCVプロテアーゼ阻害剤のスクリーニングなどのように、多数の試料についてその活性を測定しなければならない場合において、処理能力の高いELISA法の汎用性を高め、基質の変化に容易に対応できる点で有用である。この方法は、従来のELISA法に先立って、酵素反応後、生成物に抗原物質を結合させるポストラベル法である。

【0029】上記方法で使用する合成基質ペプチドは、プロテアーゼ切断で生じたアミノ基に対して特異的に標識反応を行うため、このアミノ基以外に反応しうるアミノ基が存在してはならない。また、標識反応で得ら

れた反応生成物を固定化するために、合成基質ペプチドの切断部位のC末側またはN末側をビオチンまたは抗原物質または抗体物質であらかじめ標識しておく必要がある(この標識を標識aという)。このような条件を満たす限り、基質ペプチドのアミノ酸配列は、酵素の基質特異性の範囲内で自由に設計することができる。

【0030】しかし、以下の実施例に示すように基質ペプチド中にシステインが含まれている場合には、切断反応で生じたアミノ基以外に、システインのチオール(SH)基も抗原物質で標識されることがある。このような基質ペプチドを用いる場合には、アミノ基に対する標識反応に先立って、システインのチオール基を修飾してチオール基が抗原物質で標識されないようにしなければならない。チオール基の修飾剤としては、その後のアミノ基に対する標識反応を阻害せず、さらにその後の処理にも影響しないものであれば、特に限定されない。好ましいチオール基の修飾剤は、N-メチルスルホキシド、N-エチルスルホキシドなどのN-アルキルスルホキシド、およびヨード酢酸、ヨード酢酸ナトリウムを含む。ヨード酢酸、ヨード酢酸ナトリウムは水に対する溶解度が高いため特に好ましい。これらの修飾剤は、水または緩衝液、アルコール、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドなどの溶液として用いる。反応条件は特に限定されないが、反応温度として室温〜50℃、反応時間として30分〜60分の範囲で十分である。チオール基修飾剤の量は、試料中に含まれるチオール基に対して、上記の反応条件下で完全に修飾反応が進行すればよく、特に制限はない。

【0031】次いで、上記反応での切断産物である標識ペプチドをさらに抗原物質で標識する(この標識を標識bという)。例えば、標識aを基質ペプチドの切断部位のN末側に付けた場合には、標識bをカルボキシル基に対して行う。

【0032】抗原物質としては、それに対する抗体を作製できる物質であれば、その種類は限定されない。この抗体は通常のELISAでの二次抗体に相当するものであり、実際の使用に際しては検出反応に用いる酵素で標識しなければならないため、入手の容易さから、既に酵素標識された抗体が市販されているジゴキシゲニンが適している。しかしながら、ジゴキシゲニン自体はアミノ基と反応しないため、アミノ基をジゴキシゲニンで標識するために、ジゴキシゲニンをアミノ基の修飾剤であるヒドロキスクシミド化しなければならない。すなわち、アミノ基に対する標識反応は、ジゴキシゲニン-3-0-メチルカルボニル-ε-アミノカプロン酸-N-ヒドロキスクシミドエステル(以下、DIG-NHSという)などのジゴキシゲニン標識試薬を用いて行う。DIG-NHSの溶剤としては、水と完全に混和し、DIG-NHS自身と反応しないものであれば、特に限定されない。ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミ

ドが好ましい。反応温度は特に限定されないが、室温～50℃の範囲で十分である。また、反応時間も特に限定されないが、30分～60分で十分である。DIG-NHSの濃度は特に限定されないが、反応温度、反応時間、および使用量に応じて、0.01～1mg/mlの範囲で使用可能である。

【0033】ジゴキシゲニンの標識反応には過剰量のDIG-NHSを用いるため、次の工程（固定化、酵素反応）以降の支障とならないように、未反応のDIG-NHSの不活化処理を行う。不活化処理は、過剰量のアミノ基を有する物質を加えてDIG-NHSと反応させることによって実施できる。このような物質としては、一級アミノ基を有し、水溶性の物質であれば特に限定されない。好ましい例として、アミノ酸およびその誘導体を挙げることができる。水溶液のpHは、微アルカリ性、好ましくはpH7.5～10の範囲である。濃度および使用量は、DIG-NHSの濃度および使用量に応じて変更でき、未反応のDIG-NHSと完全に反応すればよく、特に限定されない。また、反応条件も特に限定されないが、室温～50℃の範囲の温度で、30分～60分の時間で十分である。

【0034】以上の処理によりプロテアーゼ切断で生じた断片の末端アミノ基に対するジゴキシゲニンの選択的な標識が可能となる。

【0035】次いで得られたジゴキシゲニンで標識された切断断片を固定化する。ただし、請求の範囲に記載するように、固定化の時期はこの段階であっても、あるいは上述した標識を行う前であっても、あるいは酵素活性の測定直前であってもよい。

【0036】固定化を行うには、標識aに対する親和性を利用する。例えば、標識aがビオチンである場合にはアビジンまたはストレプトアビジンを、標識aが抗原である場合には該抗原に対する抗体を、標識aが抗体である場合には該抗体に対する抗原を用いて担体に固定化を行う。担体としては固体担体が好ましく、例えば任意の大きさ、形状に成型されたスチレンやポリスチレンなどの高分子担体の他、これらの材料で成型した反応容器の内壁、具体的には標識aに対して親和性を示す物質（ストレプトアビジン、抗体、抗原）をコーティングしたチューブ、マイクロタイタープレート、ビーズ、カラム担体などを用いて行う。固定化は検出感度、基質量および反応液量に応じて、ジゴキシゲニン標識反応液の全量もしくはその一部を用いて行うことができる。その際、界面活性剤を含む緩衝液で希釈することも可能である。界面活性剤としては、ノニデット（Nonidet）P-40、ツイーン（Tween）20、トリトン（Triton）X-100などの非イオン性の界面活性剤が好ましく、その濃度は0.001～1%で十分である。固定化の温度および時間は特に限定されないが、温度は4℃（冷蔵庫内）～37℃の範囲で、時間は1～24時間

の範囲で行うことができる。

【0037】未反応の基質ペプチドおよび標識された切断生成断片の固定化を行った後、反応液中の酵素などの夾雑物を除くために洗浄を行う。洗浄液には、固定化のときに用いた希釈液の他に、生化学実験で汎用されているTBS（Tris Buffered Saline）やPBS（Phosphate Buffered Saline）などの緩衝液を用いることができる。

【0038】これ以降の操作は通常のELISAと同様に行うことができる。すなわち、洗浄後、ペプチドに標識した前記抗原物質に、前記抗原に対する酵素標識された抗ジゴキシゲニン抗体（以下、酵素標識抗体という）を結合させる。結合工程の前に、固定化に用いた器具表面での非特異的吸着を防ぐために、ブロッキング試薬による処理を行うことが好ましい。ブロッキング試薬として、ウェスタンブロット法などで用いるスキムミルク、カゼインなどを用いることができる。ブロッキング処理は、4℃～37℃の温度で、1～24時間の範囲で行うことができる。

【0039】基質ペプチドの切断断片に選択的に標識されたジゴキシゲニンに対する酵素標識抗体の結合は、標識されている酵素（標識酵素）の安定性にもよるが、4℃～37℃の温度で、1～数時間の範囲で行うことができる。通常、室温中、1時間で十分である。標識酵素には、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼが多く用いられるが、特に限定されない。

【0040】結合しなかった余分の酵素標識抗体を除くために、TBSなどの緩衝液で洗浄する。その後、標識酵素に対する基質溶液を加えて、酵素反応を行う。酵素反応を酸またはアルカリによって停止させた後、酵素反応によって生じた生成物の吸光度または蛍光強度を測定する。

【0041】本発明によるこの方法を用いると、反応生成物をジゴキシゲニンなどの抗原物質で標識することによって従来のELISA法と同様の操作で測定できる。さらに、従来のELISA法では測定対象物質に対する抗体（一次抗体）が必要であったが、本発明の方法では測定対象物質に特異的な抗体を必要としないため、広範囲で使用可能である。

【0042】以下の実施例7～12では、HCVプロテアーゼとしてHCVのNS3領域、NS4A領域およびNS4B領域を含む領域由来のプロテアーゼ（345Ps）、基質ペプチドとしてビオチン化（C末端リジンのε-アミノ基）およびアセチル化（N末端アミノ基）したAc-GEGAGDIDIVPCSMSTWTK[Bio]を用いた例を示すが、本発明の方法はこの実施例に限定することなく、広く使用できる。

【0043】本発明のHCVプロテアーゼ活性測定法およびプロテアーゼ阻害剤のスクリーニングを以下の実施例により詳しく説明するが、本発明の範囲はこれに限定

されない。

【0044】

【実施例】

実施例1：酵素発現ベクターの構築

HC V 非構造領域遺伝子に相当するcDNA断片の構成および構築は先の特許出願の明細書（特願平5-18854号）、及びJ. Virol., 67, 4665 (1993)、あるいはProc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 10773 (1993)に述べるとおりである。

【0045】pMANS2d3X：特願平5-18854号に述べるとおり、ベクターpMal-cにHC VのORF（オープンリーディングフレーム）1:985 - 1325番のアミノ酸に相当するcDNA断片を挿入したものである。

【0046】pMANS34NsH：pTZ18にHC VのORF 1:722 - 1647番のアミノ酸に相当するcDNA断片を挿入したpN722 - 1647をSac II - Hind IIIで切断し、pMANS2d3Xの同じ制限酵素で切断したものに挿入し、pMANS34Nsを得た。これをEcoT22 - Hind IIIで切断し、合成DNA断片を挿入し、pMANS34NsHを得た。

【0047】pMANS34Sm：pTZ18にHC VのORF 1:722 - 1908番のアミノ酸に相当するcDNA断片を挿入したpN722 - 1908をSac II - Hind IIIで切断してえたフラグメントを、pMANS2d3Xの同じ制限酵素で切断したフラグメントと置換し、pMANS34Smを得た。pMANS345C：pTZ18にHC VのORF 1:729 - 3010番のアミノ酸に相当するcDNA断片を挿入したpN729 - 3010をSac II - Sal Iで切断し、pMANS2d3Xの同じ制限酵素で切断したものに挿入し、pMANS345Cを得た。

【0048】pMANS345Bs：pTZ18にHC VのORF 1:722 - 2472番のアミノ酸に相当するcDNA断片を挿入したpN722 - 2472をPst I - Hind IIIで切断してえたフラグメントを、pMANS345Cの同じ制限酵素で切断したフラグメントと置換し、pMANS345Bsを得た。

【0049】pMANS345Ps：pMANS345CをPst Iで切断し、再び酵素的に結合し、小さなフラグメントを欠失させpMANS345Psを得た。

【0050】実施例2：酵素の発現と精製

上記の発現ベクターで大腸菌株JM109コンピテント細胞を形質転換する。形質転換した大腸菌は50μg / μl アンピシリンを含むLBrothで一晩37℃前培養し、50μg / μl アンピシリンを含むLBrothで希釈し(20 - 30倍)、37℃約2時間培養した。濁度がOD₆₀₀ = 0.5 ~ 0.7になった時点で最終濃度0.5 mMのイソプロピルベータチオガラクトシドを加え、さらに20℃で3時間培養した後、培養液を遠心し菌体を集めた。菌体は-80℃の冷凍庫で保存した。

【0051】保存した菌体を培養液の1 / 10容のバッファA(10 mM Na-リン酸バッファpH7.2, 30 mM NaCl, 10 mM ベータメルカプトエタノール)に懸濁し、超音波破砕機で氷冷下10分細胞を破砕した。遠心分離して上清

を得、上清に70 % 飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、蛋白を沈殿させた。沈殿を遠心分離で集め、上清の1 / 2容のバッファAに溶解し、アミロース樹脂カラムにアプライした。カラムはバッファAで洗浄後、バッファB(10 mM Na-リン酸バッファ pH7.2, 30 mM NaCl, 10 mM ベータメルカプトエタノール, 0.2 % Tween 20)、バッファC(10 mM Na-リン酸バッファ pH7.2, 500 mM NaCl, 10 mM ベータメルカプトエタノール)で洗浄した。カラムに結合した蛋白を10 mM マルトースを添加したバッファAで溶出した。溶出した蛋白は限外濾過で濃縮し、最終濃度が50 %になるようにグリセロール添加し、-20℃の冷凍庫で保存した。得られた酵素を分析した。即ち、得られた酵素標品をサンプルバッファに溶解し、100℃5分加熱した後、SDS-ポリアクリルアミドゲルにアプライし電気泳動後、クーマシーブリリアントブルーで染色した。あるいは電気泳動後、展開した蛋白をPVDF膜にトランスファーし、抗NS3抗体および抗MBP抗体でウエスタンブロットした。

【0052】実施例3：基質ペプチドの合成

ペプチドDns-GEAGDDIVPC SMSYTWGAL, Dns-GEAGDDIVAC SMSYTWGAL, Dns-GEAGDDIVPN SMSYTWGAL, Dns-GEAGDDIVP(D)C SMSYTWGAL, Dns-GEAGDDIVPC SMSYTW, Dns-GEAGDDIVPC SMS, Dns-GEAGDDIVAC SMS, Dns-GEAGDDIVCC SMS, Dns-DDIVPC SMSYT, Dns-DDIVPC SMS, Dns-DDIVPC SMSYTWT, Dns-GEAGDDIVPC SMSYTWTK, Dns-GEAGDDIVSC SMSYTWGAL, Dns-WINEDCSTPC SGWLKDVWP, Dns-YQEFDEMEEC ASHLPIYIEQGはペプチド合成機を用いて固相法で行なった。すなわち、αアミノ基をt-ブチルオキシカルボニル基で保護し、側鎖のカルボキシル基をシクロヘキシル基、水酸基をベンジル基、チオール基をメチルベンジル基、そしてε-アミノ基をベンジルオキシカルボニル基で保護した第2アミノ酸を、カルボキシル基が樹脂に結合したαアミノ基が無保護の第1アミノ酸にジシクロヘキシルカーボジイミドを用いて縮合した後、α-アミノ基の保護をトリフロロ酢酸で除去した。第3以下のアミノ酸についても同様にして順次C端からN端へ合成した。全鎖合成後α-アミノ基の保護をトリフロロ酢酸で除去し、ダンシルクロリドで修飾し、樹脂からの切り出しと脱保護をフッ化水素で行ない上記各ペプチドを得た。

【0053】Ac-GEAGDDIVPC SMSYTWTK-Bioは、α-アミノ基を保護し、樹脂に固相化したリジンのε-アミノ酸をビオチン化し、保護したアミノ酸を用いて固相合成後、N末端をアセチル化した後に脱保護した。

【0054】Dig-GEAGDDIVPC SMSYTWTK-Bioは同様な固相合成、脱保護の後ジスルフィド結合を形成させ、N末端アミノ基の標識をジゴキシゲニン-3-0-サクシニル[2-(N-マレイミド)]エチラミド(Digoxigenin-3-0-succinyl-[2-(N-maleimido)]-ethylamid)で行ないDTTでジスルフィド結合を切断し得た。

【0055】実施例4：酵素反応

標準的な酵素反応は以下のような条件で行った。50 mM Tris HCl pH 7.6、30mM NaCl、10 mM DTT、酵素蛋白4 μg - 8 μg を含む酵素反応液100 μl に、DMSOあるいは水溶液で溶解した試験化合物を最終濃度が1 - 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加え、37℃15分ブレインキュベーションし、HPLC法ではN末端を蛍光標識したペプチド基質(DMSO溶液)最終濃度86 μM (最終DMSO濃度: 2%)を添加して反応を開始した。37℃で反応した後、90℃5分加熱して反応を止め、氷上保存した。ELISA法では、NあるいはC末端を蛍光標識、あるいはアフィニティー標識した基質を同様に反応させた。

【0056】実施例5：検出

(1) HPLC法

反応液5 μl をとり、逆相HPLC($\phi 4.6 \text{ mm} \times 15 \text{ cm}$)にアプライした。カラムは50 mM 酢酸アンモニウム(pH 6.5)中 22.5% \rightarrow 60%のアセトニトリルの直線濃度勾配(10分)で溶出し、未反応のペプチド基質と切断産物のN末端側断片の蛍光シグナルをexcitation: 340 nm, emission: 510 nmで検出した。切断率は両者の面積の比から求めた。

【0057】(2) ELISA法

N末端にジゴキシゲニン(Dig)で標識し、C末リジンの側鎖のアミノ基をビオチン(Bio)標識した基質Dig-GEAGDDIVPC SMSYTWK-Bioを酵素反応した後、反応液1 μl をとり、2% 2-メルカプトエタノールと0.01% NP-40を加えた燐酸緩衝液(pH8.5)で2000倍に希釈し、10 μl をストレプトアビジンでコートしたマイクロタイタープレートに加えた。室温1時間放置後、プレートを洗浄し、アルカリフォスファターゼ標識抗Dig抗体と室温1時間反応した。プレートを洗浄後、アルカリフォスファターゼ基質2, 2'-アジド-3-(3-エチルベンズチアゾリンスルフェート)(2,2'-Azido-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfate))溶液200 μl を加え室温10分反応し、1 N NaOH 50 μl を加え反応を停止した。405 nmの吸光度を測定し、残存Dig量を検出した。

【0058】実施例6：結果

(1) 酵素の名称

上記のように発現プラスミド pMANS34NsH、pMANS34Sm、*

*pMANS345C、pMANS345Bs、pMANS345Psを大腸菌に感染させ、マルトース結合蛋白と融合蛋白として発現し、アミロース樹脂で精製した酵素をそれぞれ34NsH、34Sm、345C、345Bs、345Psと称する。図1に各々発現プラスミドの名称と挿入したIICV遺伝子の領域をしめす。

【0059】(2) 酵素反応の検出

酵素345Ps 0.04 μg と合成基質Dns-GEAGDDIVPC SMSYTWKを上記の条件で反応したときのHPLCのクロマトグラムを図2に示す。未反応の基質は保持時間7~8分に、切断を受けた産物は保持時間3~4分にそれぞれに溶出された。この時切断率は24%であった。

【0060】(3) 時間反応曲線

34NsH、34Sm、345C、345Bs、345Ps各0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ を上記の反応条件で合成基質Dns-GEAGDDIVPC SMSYTWKと反応させた時間反応曲線を図3に示す。反応は経時的に進行し、2時間後には34Sm、345C、345Bs、345Psでは基質の90%以上が切断された。しかし、34NsHでは反応の進行は他の酵素の比べ著しく遅かった。

【0061】次いで切断された反応液中のペプチドのN末端をアミノ酸シーケンサーで分析した。未切断の基質および切断産物のN末端側の断片はダンシル基でアミノ末端が保護され、分析されず、切断産物のC端の断片のN末端からのアミノ酸配列が分析できるが、結果は期待されたとおりのSMSYTWKのアミノ酸配列であり、切断が正しい切断部位で起こっていることを確認した。

【0062】(4) 反応速度

34NsH、34Sm、345C、345Bs、345Psの反応速度を比較した。反応条件は酵素 0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、標準溶液(50 mM Tris HCl (pH7.6), 30 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 10mM DTT)中、37℃でブレインキュベーション 30分後、0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の基質をいれ、37℃10分反応した。反応は70℃5分加熱して止めた。得られた結果を以下の表IIに示す。表IIから明らかなように、切断活性は345Ps、345Bsが最高であり、345C、34Smの順であった。34NsHはこれらに比し著しく低かった。

【0063】

【表1】

表II

	V _{max} (n mol/min μg protein)	K _m (mM)
34NsH	0.926	0.126
34Sm	3.44	0.122
345Ps	8.45	0.144
345Bs	8.62	0.180
345C	7.57	0.24

【0064】(5) 阻害剤の効果

実施例4に記載の方法を用いて、セリンプロテアーゼ阻 50 害剤の一つであるPMSF(フェニルメタンスルホニルフロリド)のプロテアーゼ活性に及ぼす効果を調べた。酵

素には345Psを、基質には Dns-GEAGDDIVPC SMSYTWT を用い、1mM および 10mM 濃度のPMSF の効果を検討した。対照としてプロテアーゼ活性をもつトリプシンを用いた。

【0065】得られた結果を図4に示す。プロテアーゼ活性は、トリプシンと同様に10mM PMSFで阻害を受けたが、その程度はトリプシンより小さかった。

【0066】実施例7：チオール基修飾

実施例4に記載の方法によって得られた反応液（反応時間：3時間）を試料として用いた（この反応液には、HPLC分析により未反応基質の存在は認められなかった）。

【0067】（1）チオール基の修飾

5μlのN-エチルマレイミド（100mM、エタノール溶液）に1μlの反応液を加え、攪拌後、室温（23℃）で30分、チオール基の修飾反応を行った。これに5μlのDIG-NHS（ペーリンガー・マンハイム社製：0.4mg/ml、ジメチルスルホキシド溶液）を加え、攪拌した後、さらに室温で30分反応を行った。次いで10μlのグリシン水溶液（500mM、水酸化ナトリウムでpHを8.5に調節）を加えて、さらに室温で90分反応を行った。このようにして得られた反応液に、100μlの固定用希釈液（50mM、リン酸緩衝液（pH8.5）、0.01%ノニデットP-40）を加えて攪拌した。

【0068】（2）プレートへの固定

表III

チオール基修飾の効果（吸光度）

修飾	反応液	未反応液	TBS
有	1.583	0.243	0.234
無	1.752	1.071	0.230

【0071】実施例8：反応生成物量と吸光度との関係（1）

実施例7で用いた反応液および未反応液のそれぞれを等量のジメチルスルホキシドで希釈した後、ビオチン量が一定になるように両者を種々の割合で混合した。得られた混合試料の1μlを用いて、実施例7と同様の操作を行った（室温：23℃）。ただし、N-エチルマレイミド処理およびジゴキシゲニン標識反応は37℃で行った。得られた結果を図5に示す。

【0072】実施例9：反応生成物量と吸光度との関係（2）

実施例7で用いた反応液および未反応液のそれぞれを2倍量のジメチルスルホキシドで希釈した後、ビオチン量が一定になるように両者を種々の割合で混合した。マイクロタイタープレートに2μlの混合試料を入れ、実施例7と同様の操作を行った（室温：23℃）。ただし、N-エチルマレイミドの代わりにヨード酢酸ナトリウム（100mM、TBSに溶解）を用い、DIG-NHSの濃度は0.2mg/mlとした。チオール基の修飾反

*（1）の全量をストレプトアビジン・コーティド・マイクロタイタープレート（ペーリンガー・マンハイム社製）に入れ、攪拌し、室温で放置した。1時間後、内容物を捨て、350μlの固定用希釈液、TBSで順次洗浄した。300μlの50%ブロックエース（大日本製薬（株）社製：TBSで希釈）を加え、1時間放置した。内容物を捨て、300μlのTBSで2回洗浄した。

【0069】（3）抗ジゴキシゲニン抗体およびアルカリホスファターゼによる標識

（2）で得られたプレートに200μlのアルカリホスファターゼ標識の抗ジゴキシゲニン抗体（ペーリンガー・マンハイム社製：TBSで1000倍に希釈：0.75U/ml）を加え、1時間放置した。300μlのTBSで2回洗浄した後、アルカリホスファターゼの基質として200μlのp-ニトロフェノールリン酸2ナトリウム溶液（2.5mg/ml：100mM炭酸ナトリウム緩衝液（pH9.8）、2mM塩化マグネシウム）を加え、室温（23℃）で15分反応を行った。50μlの水酸化ナトリウム（1N）を加えて反応を停止させ、吸光度（405nm）を測定した。同様の処理を未反応液（基質溶液）およびTBSを用いて行った。さらに、チオール基の修飾としてのN-エチルマレイミド処理を行わない場合についても、同様の操作を行った。得られた結果を表IIIに示す。

* 【0070】

応およびジゴキシゲニン標識反応は37℃で30分、グリシン処理は37℃で45分を行った。また、アルカリホスファターゼの発色時間は10分とした。得られた結果を図6に示す。

【0073】実施例10：測定値のバラツキ

反応液および未反応液のそれぞれを4倍量のジメチルスルホキシドで希釈した後、ビオチン量が一定になるように両者を種々の割合で混合した。得られた混合試料の2μlを用いて、実施例9と同様の操作を行った（室温：23℃）。ただし、ヨード酢酸ナトリウム処理およびジゴキシゲニン標識反応は37℃で35分、グリシン処理は15μlのグリシン溶液を加え、37℃で40分を行った。ストレプトアビジン・コーティド・マイクロタイタープレートへの固定化は、100μlの固定用希釈液を入れ、この中に10μlのグリシン処理反応液を加えた。また、アルカリホスファターゼの発色時間は15分とした。得られた結果を表IVに示す。

【0074】

表IV

測定値(吸光度)のバラツキ (n=6)					
反応液	未反応液	最小値	最大値	平均値	誤差(*)
0	10	0.236	0.268	0.245	0.048
1	9	0.339	0.412	0.375	0.061
2	8	0.429	0.523	0.482	0.062
3	7	0.566	0.668	0.604	0.059
4	6	0.705	0.789	0.756	0.037
5	5	0.886	1.019	0.948	0.043
<hr/>					
0	0	0.224	0.235	0.229	0.016

*: 標準偏差/平均値

【0075】実施例11: プロテアーゼ阻害剤を含む場合

プロテアーゼ阻害剤としてPMSF(フェニルメタンスルホニルフルオリド)処理を行った酵素反応液を用いた。反応停止は4倍量のジメチルスルホキシドを加えた。1μlの停止反応液を用いて、実施例10と同様な操作を行った。得られた結果を表Vに示す。

【0076】表V

PMSFによる阻害

PMSF濃度	活性(切断%)
10mM	71
1mM	87
0mM	100

【0077】実施例12: 測定の適応範囲

試料として、基質ペプチドの切断断片のSMSYTWTK[B10]を用いた。2μlの試料溶液(ジメチルスルホキシドに溶解したもの)に対して、実施例10と同様に、ヨード酢酸ナトリウム処理(37℃、30分)、ジゴキシゲニン標識(37℃、30分)、およびグリシン処理(37℃、40分)を行い、その10μlを固定化した。発色反応は室温(24.5℃)で10分を行った。これらの操作を種々の濃度で行い、その結果を図7に示す。

【0078】

【発明の効果】本発明のHCVプロテアーゼ活性測定法は、試験管内で実施することができるので、細胞培養系に比べて極めて短時間で測定を行うことができる。また、無菌操作などの煩雑な操作を伴わず、使用する施設も簡単なものでよい。さらに、細胞を用いないので、細胞培養系に比べて測定間のバラツキがなく、信頼のおける結果が得られる。放射性同位体などの検出方法を用いる必要がない点も本発明の利点である。また、本発明のHCVプロテアーゼ阻害剤のスクリーニング法を用いると、極めて簡単かつ確実に阻害剤のスクリーニングを行うことができ、抗HCV剤の開発におおいに利用でき

る。

【0079】さらに、発色原子団を遊離させることによって活性測定が困難なプロテアーゼに対しては、酵素反応後に生成物に抗原物質を結合させるポストラベル法によるELISA法を用いる本発明のHCVプロテアーゼ活性測定法が有利である。この測定法は基質の変化に容易に対応でき、極めて応用範囲が広い。

20 【図面の簡単な説明】

【図1】HCV前駆体ポリプロテイン構造、および本発明で使用した発現プラスミドの名称とそれぞれに挿入したHCV遺伝子の領域を示す。なお、図中、アミノ末端側のCはウイルスコアタンパク質、E1およびE2はエンベロープタンパク質1および2を表し、これらはウイルス構造タンパク質に相当する。それよりド流領域からの産物はウイルス複製に機能する非構造タンパク質(NS)に相当する。

30

【図2】酵素345Psと合成基質Dns-GEAGDDIVPC SMSYTWTKを反応させたときのHPLCのクロマトグラムである。

【図3】酵素34NsH、34Sm、345C、345Bs、346Psを合成基質Dns-GEAGDDIVPC SMSYTWTKと反応させたときの時間反応曲線を示す。

【図4】酵素345Ps、合成基質Dns-GEAGDDIVPC SMSYTWTKを用い、阻害剤としてPMSFを添加したときの効果、ならびに同濃度のPMSF存在下におけるトリプシンの基質N-ベンゾイルFVR(Phc-Val-A

40

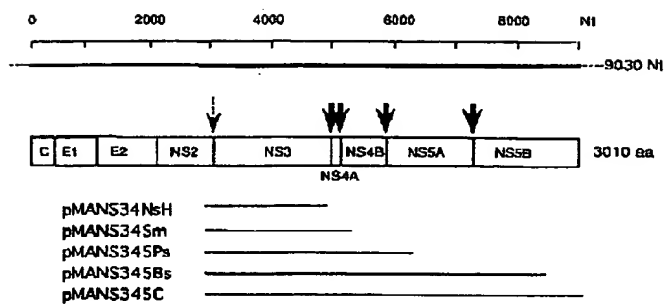
rg)-p-ニトロアニリド切断反応の結果を示す。

【図5】N-エチルマレイミド処理を行った場合の反応生成物量と吸光度(405nm)との関係を示す。

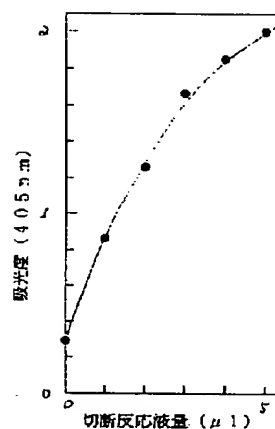
【図6】ヨード酢酸ナトリウム処理を行った場合の反応生成物量と吸光度(405nm)との関係を示す。

【図7】ヨード酢酸ナトリウム処理を行った場合の測定適応範囲を示す。

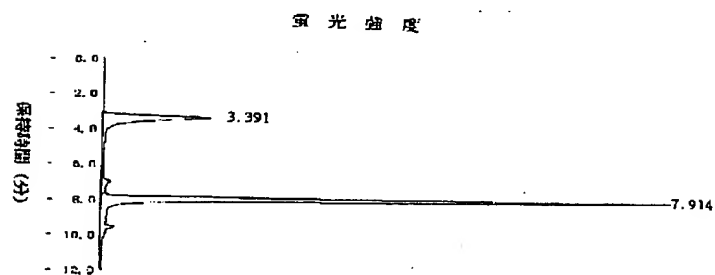
【図1】



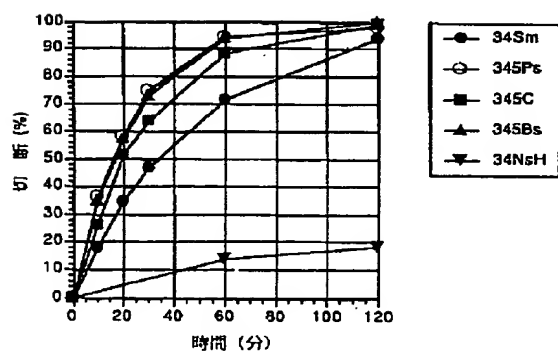
【図6】



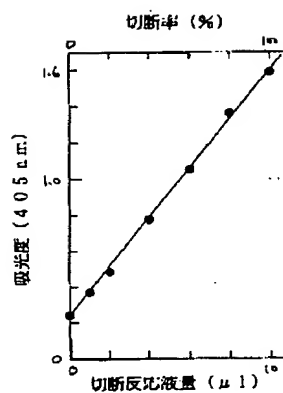
【図2】



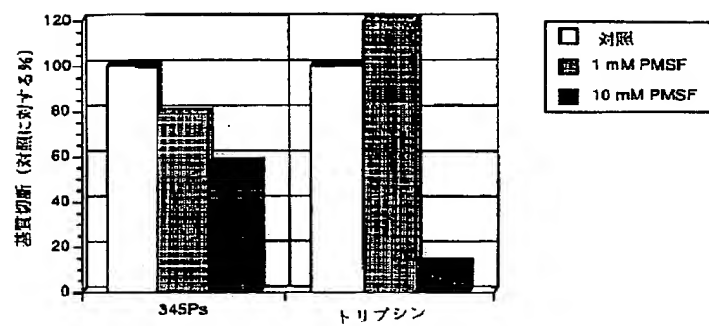
【図3】



【図5】



【図4】



【図7】

